

BEST AVAILABLE COPY

ROYAUME DE BELGIQUE

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES
ADMINISTRATION DE LA POLITIQUE COMMERCIALE



RECEIVED

JUL 1 2 2002

TECH CENTER 1600/2900

Il est certifié que les annexes à la présente sont la copie fidèle de documents accompagnant une demande de brevet d'invention tels que déposée en Belgique suivant les mentions figurant au procès-verbal de dépôt ci-joint.

Bruxelles, le 16.6.2002

Pour le Conseiller de l'Office
de la Propriété industrielle

Le fonctionnaire délégué,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Bailleux G".

BAILLEUX G
Conseiller adjoint





OFFICE DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

PROCES-VERBAL DE DEPOT
D'UNE DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

Nr.: 09201087

Aujourd'hui, le 10-12-1992 à 10 heures, 35 minutes,

M VAN MALDEREN

agissant en tant que Demandeur.
 Employé du demandeur.
 Employé d'un établissement effectif du demandeur.
 Mandataire agréé.
 Employé du mandataire agréé, M
 Avocat.

se présente à l'OFFICE DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE et y dépose une demande en vue d'obtenir un brevet d'invention relatif à SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DESTINEE AU TRAITEMENT DU CANCER ET DES INFECTIONS.

demandé par Z. COMPANY S.A.

Avenue Général de Gaulle, 40
B 1050 BRUXELLES (Belgique)

La demande, telle que déposée, contient les documents nécessaires pour obtenir une date de dépôt conformément à l'article 16, paragraphe 1er, de la loi du 28 mars 1984 sur les brevets d'invention.

Le déposant.

Le fonctionnaire délégué

W. G. CANTRELL

W. SCHIETTECATTE

Bruxelles, le

10-12-1992

10 SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE DESTINÉE AU TRAITEMENT DU CANCER
 ET DES INFECTIONS

Objet de l'invention

La présente invention concerne une séquence nucléotidique destinée au traitement de cellules cancéreuses ou 15 soumises à des infections.

L'invention s'étend également à l'utilisation de séquences nucléotidiques pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de cellules cancéreuses ou soumises à des infections.

20 Arrière-plan technologique

L'efficacité des traitements conventionnels du cancer et des infections est limitée par leur manque de sélectivité. En effet, la toxicité liée à ces traitements ne se limite pas aux cellules cibles (cellules tumorales, cellules infectées), elle affecte aussi des cellules normales 25 d'importance vitale.

En conséquence, on a développé des systèmes de ciblage d'agents thérapeutiques qui permettent de diminuer la dose毒ique administrée aux tissus normaux tout en permettant à une dose毒ique efficace d'être administrée aux 30 tissus pathologiques.

Le brevet US-4 675 382 décrit des protéines hybrides clivables et constituées de fragments cytotoxiques et de ligands cytospécifiques, ainsi que leur application thérapeutique ciblée dans le traitement de désordres médicaux.

Des protéines qui sont hautement cytotoxiques lorsqu'elles sont introduites dans les cellules de mammifères sont produites par beaucoup d'espèces de bactéries et de

plantes (fragment A de la toxine diphtérique (DT-A), de *Pseudomonas aeruginosa*, du Ricin...).

Des tentatives ont été faites pour remplacer la portion de ces protéines responsable de l'entrée cellulaire 5 par des ligands spécifiques de tumeurs (anticorps monoclonaux, peptides...) (Martinez et al, Cancer Surveys, 1, 374 (1982)).

Une autre stratégie employée par Maxwell (Cancer research 46, 4660-4664, september 1986), consiste à introduire 10 l'ADN codant pour le fragment A de la toxine diphtérique, in vitro dans des cellules à l'aide de constructions comportant des éléments de régulation transcriptionnelles spécifiques de tissus agissant en cis dans le but de n'exprimer 15 la DTA que dans les cellules contenant les facteurs agissant sur ces éléments de régulation.

D'autres techniques utilisent des gènes codant pour un enzyme conférant à la cellule transfectée une sensibilité à un agent toxique ont été décrites par Moolten F. (Human Gene Therapy 1: 125-134 (1990) et Venkatesh (P.N.A.S., 20 vol. 87, p. 8746-8750, novembre 1990).

Le gène codant pour la Thymidine kinase de l'Herpès simplex type 1 (HSV-TK) est approprié à ce type de thérapie. Certains analogues de la guanosine tels que l'iodovinyl-déoxyuridine (IVDU), l'acyclovir, le ganciclovir sont des 25 substrats spécifiques pour l'HSV-TK, qui catalyse leur phosphorylation en monophosphates de façon plus efficace (plus de mille fois) que les thymidine kinases des cellules de mammifères. Une phosphorylation ultérieure en triphosphates sous l'influence de kinases cellulaires convertit ces molécules en de puissants inhibiteurs de la synthèse d'ADN. Des 30 doses de ganciclovir, n'affectant pas la survie in vitro de cellules HSV-TK négatives, permettent de détruire in vitro des cellules HSV-TK positives et d'éradiquer les lymphomes HSV-TK positifs in vivo chez des souris transgéniques exprimant 35 l'HSV-TK dans leurs cellules lymphoïdes.

Toutefois, pour certaines lignées cellulaires exprimant l'HSV-TK la dose d'analogues de guanosine permettant une cytotoxicité in vitro proche de 100% de mort

cellulaire induit une cytotoxicité appréciable dans des lignées cellulaires n'exprimant pas l'HSV-TK (doses entre 10 et 100 μ M).

Une approche permettant d'éviter ce problème est 5 d'utiliser des analogues de la guanosine marqués à l'aide de radio-isotopes émetteurs d'électrons AUGER tels que l'Iode 123 (demi-vie 13h21). Ces isotopes relâchent la majeure partie de leur énergie sur un parcours de quelques nanomètres. L'efficacité de tels radio-isotopes en ce qui 10 concerne la cytotoxicité cellulaire est complètement perdue lorsqu'ils ne sont pas liés ou tout au plus à une distance de quelques nanomètres de l'ADN. S'ils sont dans le voisinage de l'ADN, une cinquantaine de désintégrations sont suffisantes pour tuer la cellule HSV TK positive. Une cytotoxicité 15 maximale est obtenue lorsque les cellules incorporent l'analogue de la guanosine marqué à l'Iode 123 dans leur ADN à des doses inférieures à 10^{-10} M ce qui est largement inférieur au seuil de toxicité de cet analogue pour les cellules ne possédant pas de HSV-TK.

20 En outre, l'Iode 123 est également émetteur d'un rayonnement γ qui peut être détecté à l'aide d'une gammacaméra en clinique.

Après concentration in vivo de l'analogue marqué dans les tissus exprimant l'HSV-TK et l'élimination de l'analogue de la guanosine du flux sanguin et des autres tissus, 25 il y a possibilité de détecter à l'aide d'une gammacaméra les tissus exprimant l'HSV-TK (application à la détection de métastases).

Cette approche, comparée à l'expression du fragment 30 A de la toxine diphtérique, a l'avantage de permettre un contrôle de l'intensité et du déroulement de l'attaque cytotoxique.

L'administration de l'analogue de la guanosine peut être modulée en fonction de l'évolution clinique (évolution 35 des tissus cancéreux et toxicité infligée aux tissus normaux).

Dans la demande de brevet WO 90/11359, Baltimore et al. décrivent des constructions nucléotidiques

recombinantes comportant des séquences régulatrices du virus HIV et des séquences codant pour des produits cytotoxiques affectant spécifiquement les cellules infectées par les virus HIV ou HTLV.

5 La séquence virale conservée est constituée de tout ou partie de la séquence régulatrice LTR (Long Terminal Repeat) du virus. Cette séquence peut être transactivée au niveau d'une séquence promotrice TAR par les facteurs de transactivation viraux spécifiques TAT des virus HIV et TAX 10 des virus HTLV, exprimés dans les cellules infectées par ces virus (Sodroski J. et al., Science (1985) 227, 171-173).

15 L'activation de la séquence promotrice permet ensuite l'expression de la séquence codant pour des produits cytotoxiques entraînant la mort des cellules infectées par le virus HIV.

Cependant de telles constructions nucléotidiques peuvent comporter des séquences de LTR, autres que la séquence TAR.

20 Ces séquences, telles que les éléments enhancer NF-Kappa B (Greene, Annual Rev. Immunol., 1990, 8, p. 453) sont transactivables par des activateurs cellulaires, ou telles que l'élément NRE (Negative Regulatory Element) sont transactivables par le facteur viral NEF (Kieny, Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 3, p. 395 (1990)).

25 De tels facteurs peuvent donc activer les gènes cytotoxiques dans des cellules saines ou les désactiver dans des cellules infectées par le virus.

La demande de brevet WO 90/07936 et le document "Aids Research and Human Retroviruses" (vol. 8, n° 1, 1992, 30 Mary Ann Liebert, Inc., Publisher) décrivent l'intégration dans des vecteurs viraux ou des plasmides des constructions nucléotidiques comportant des séquences régulatrices transactivables par des facteurs spécifiques d'une affection (telle que le SIDA) et des séquences codant pour des produits cytotoxiques affectant spécifiquement les cellules soumises à des désordres hyper-prolifératifs ou à des infections.

Cependant, ces vecteurs viraux ou plasmidiques présentent un danger potentiel en s'intégrant dans les cellu-

les hôtes d'activer des protooncogènes ou d'annihiler des gènes suppresseurs de tumeurs.

Buts de l'invention

L'invention a pour but de fournir un vecteur viral 5 intégrant une séquence nucléotidique susceptible de détruire ou de normaliser des cellules cancéreuses ou soumises à des infections.

Un autre but de l'invention consiste à fournir un vecteur viral qui, sans s'intégrer dans leur génome, est 10 susceptible de s'exprimer efficacement dans l'environnement intracellulaire desdites cellules.

Eléments principaux de l'invention

L'invention concerne une séquence nucléotidique destiné au traitement de cellules cancéreuses ou soumises à 15 des infections, comprenant, intégré dans un vecteur viral appartenant au groupe des parvovirus, un gène effecteur susceptible d'assurer la destruction ou la normalisation des cellules.

On entend par le terme "traitement" une réduction 20 ou un allégement des symptômes de l'affection, l'élimination ou l'inhibition des agents causaux, la prévention de l'infection ou du désordre cellulaire du sujet soumis à l'affection.

Le terme "infection" se rapporte à des infections de cellules par des agents viraux, bactériens ou d'autres 25 parasites infectieux intracellulaires.

L'invention concerne tout particulièrement des agents infectieux viraux tels que le HIV-I, le HIV-II, le HIV-III, le HTLV-I, le HTLV-II, l'herpès simplex virus (HSV), le cytomégalovirus (CMV), les papillomavirus humains (HPV) 30 et d'autres virus similaires.

Les vecteurs les plus appropriés pour ce transfert génique *in vivo* sont les virus appartenant au groupe des parvovirus autonomes. Ce sont de petits virus sans enveloppe dont le génome est constitué d'un ADN simple brin linéaire 35 d'environ 5 KD. Leur faible complexité génétique les rend totalement dépendant de facteurs exogènes pour leur réplication. Ils ne se répliquent efficacement que dans l'environnement intracellulaire des cellules tumorales dans

lesquelles ils se trouvent sous forme épisomique (J. Rommelaere, *Handbook of Parvoviruses*, 1990, vol. 2, p. 41-57, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida).

Ils ne s'intègrent pas dans le génome des cellules 5 comme les rétrovirus et ne présentent donc pas le danger potentiel d'activer des protooncogènes ou d'annihiler les gènes suppresseurs de tumeurs. Leur oncotropisme et leur caractère épisomique en font des vecteurs de choix pour la thérapie génique ciblée de tumeurs et d'infections intracellulaires.
10

Préférentiellement, le vecteur viral utilisé est le Parvovirus H1 ou le Parvovirus fibrotropique du "minute virus of mice" (MVMp).

La plupart des lignées de cellules cancéreuses 15 humaines testées à ce jour se sont révélées permissives pour l'infection par les parvovirus H1 et le variant fibrotropique du "minute virus of mice (MVMp)". Ces virus ont des propriétés oncoprotectrices *in vivo* et peuvent causer la régression de tumeurs humaines en souris nues même après inoculation virale 20 à un site distant de la tumeur. L'H1 et le MVMp sont de petits virus contenant un ADN simple brin de 5 kb bordé de 2 boucles palindromiques en épingle à cheveu.

Chez ces parvovirus, deux promoteurs, P4 et P38, contrôlent respectivement l'expression de deux protéines non 25 structurelles (NSI et NSII) et de deux protéines de capsides (VP1 et VP2). P4 contrôle NSI et NSII et P38, VP1 et VP2. NSI est un facteur de transactivation de P38 et est responsable de l'activité cytotoxique. NSI est en outre nécessaire pour la réplication virale et la restriction ou permissivité pour 30 l'infection virale semble liée au niveau de transcription de NSI.

Préférentiellement, le vecteur viral utilisé est choisi parmi le Parvovirus H1 et le Parvovirus variant fibrotropique du "Minute virus of Mice" (MVMp).

35 Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, le vecteur viral est dépourvu des gènes codant pour les protéines de capsides (VP1 et VP2) du parvovirus. Préférentiellement, le vecteur viral est également dépourvu

du promoteur P38 et des gènes codant pour les protéines non structurelles NSI et NSII du Parvovirus.

L'expression "assurant la destruction ou la normalisation des cellules" signifie que lors d'une infection ou 5 à l'occasion d'un cancer, l'expression du gène effecteur dans la cellule hôte permet soit de tuer celle-ci, soit de la rendre sensible à un agent exogène toxique ou soit de la rendre capable d'inhiber l'action du cancer ou de l'agent infectieux.

10 Le terme "gène effecteur" se rapporte à une séquence nucléotidique qui, lorsqu'elle s'exprime (par l'action de facteurs de transactivation spécifique sur la séquence régulatrice), permet de détruire ou de normaliser les cellules traitées.

15 Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, le gène effecteur code soit pour une protéine cytotoxique, préférentiellement le fragment A de la toxine diphtérique (DTA); soit pour une enzyme conférant à la cellule transfectée une sensibilité à un agent toxique, l'enzyme sera 20 préférentiellement la thymidine kinase de l'Herpès simplex virus type 1 (HSV-TK).

25 Parmi les différentes protéines cytotoxiques disponibles (DT-A, RicinA, Gelonine, Toxine de *Pseudomonas aeruginosa*) le choix de la DT-A semble approprié. En effet, comme la majorité de la population a été vaccinée contre la toxine diphtérique, tout éventuel relargage de DT-A par les cellules mortes sera annihilé par le système immunitaire. En outre, comme la DT-A est dépourvue de site de liaison à un 30 récepteur cellulaire, elle ne pourra pas entrer dans d'autres cellules.

La production de DT-A dans les cellules de mammifères résulte en l'inhibition de toute synthèse protéique ultérieure (par ADP riboylation du facteur d'elongation -2) et par conséquent mène à la mort cellulaire. Comme la DTA 35 agit de façon catalytique et non stoechiométrique, quelques molécules de DTA sont suffisantes pour tuer une cellule.

Le fragment A libéré dans les cellules infectées par HIV non seulement entraîne la mort cellulaire, mais

bloque également toute synthèse protéique y compris la synthèse des protéines virales et de ce fait bloque la réinfection des cellules voisines.

5 Avantageusement, le gène effecteur peut être modifié par exemple par une mutagénèse dirigée afin d'atténuer la cytotoxicité de la protéine produite.

10 Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, la séquence nucléotidique comprend également au moins une séquence régulatrice transactivable par des facteurs de transactivation spécifique de l'affection traitée ou du tissu cellulaire affecté, et apte à cisactiver le gène effecteur.

15 Le terme "séquence régulatrice transactivable" se rapporte à une séquence nucléotidique qui est capable de répondre à un facteur de transactivation spécifique et d'activer en réponse la transcription de gènes situé en cis.

20 Selon une autre forme d'exécution de l'invention, la séquence régulatrice comporte tout ou partie de la séquence régulatrice LTR (Long terminal Repeat) des virus HIV ou HTLV comprenant la séquence TAR (TAT responsive element).

Préférentiellement, la séquence LTR est dépourvue de la séquence enhancer Kappa B transactivable par des facteurs cellulaires et/ou de la séquence NRE transactivable par le facteur viral NEF.

25 La suppression de ces séquences au sein de la séquence LTR réduisent de manière surprenante l'expression de la séquence nucléotidique de l'invention dans les cellules n'exprimant pas la protéine TAT sans diminuer l'expression de la séquence nucléotidique de l'invention dans les cellules exprimant la protéine TAT.

30 Avantageusement, la séquence nucléotidique comporte également une séquence régulatrice constituée de tout ou partie de la séquence RRE (Rev-Responsive Element) et de la séquence adjacente CRS des virus HIV et HTLV (Rosen, 35 P.N.A.S., vol. 85, p. 2071-2075 (1988)) et de sites adjacents d'épissages.

Les séquences TAR (situées dans le LTR des virus HIV et HTLV et transactivables par les protéines virales TAT

du HIV et TAX du HTLV) et RRE (situées dans la séquence ENV des virus HIV et HTLV et répondant aux protéines REV du HIV et REX du HTLV) et des sites adjacents d'épissages sont par exemple des séquences utilisables pour le traitement des 5 infections par ces rétrovirus (Rosen G., Editorial Review, Aids 1990, 4, 499-509).

Le grand degré de conservation de ces séquences permet de traiter les cellules infectées par les différentes souches de HIV à l'aide de la même construction 10 nucléotidique.

On place également la séquence du gène effecteur sous le contrôle de la protéine Rev de HIV, car en l'absence de Rev, tout mRNA qui contient la séquence RRE est bloqué dans le spliceosome nucléaire et ne peut être exporté dans 15 le cytoplasme vers les ribosomes.

Selon une autre forme d'exécution de l'invention, la séquence régulatrice est constituée d'une séquence promoteur "enhancer" spécifique du cytomégalovirus et le gène effecteur est un ribozyme clivant spécifiquement l'ARN messager codant pour la protéine α du cytomégalovirus (Griffiths 20 P., Biochem J., 241, p. 313-324 (1987)).

Selon une autre forme d'exécution de l'invention, les séquences régulatrices sont constituées de promoteurs et/ou d'enhancers transactivables dans certains tissus 25 spécifiques, choisis parmi:

- la séquence d'ADN contrôlant l'expression du gène codant pour l' α foetoprotéine (AFP), cette région n'étant transactivée que dans les cellules d'hépatomes, de choriocarcinome et dans de rares cellules hépatiques (Sakai M., The Journal of Biological Chemistry, vol. 260, n° 8, p. 5055-5060 et Nakabayashi H., vol. 264, n° 1, p. 266-271);
- la séquence contrôlant l'expression de la protéine placentaire humaine 11 (PP11). La PP11 n'est exprimée que dans le placenta (syncytiotrophoblaste) et on ne la trouve dans aucun tissu adulte normal, mais par immunohistochimie on la détecte dans 47% des cancers du sein, dans 67% des carcinomes ovariens, et dans 38% des cancers testiculaires et gastriques étudiés (Grundmann U., DNA and Cell Biology,

vol. n° 9, n° 4, 1990, p. 243-250);

- la séquence contrôlant l'expression de l'antigène CO - 029 qui est détectée dans des carcinomes de l'estomac, du côlon, du rectum et du pancréas mais n'est pas détecté dans les tissus normaux (Szala S., PNAS, vol. 87, p. 6833-6837 (1990));
- la séquence contrôlant l'expression de l'antigène H23 (breast-cancer-associated antigen) détecté chez l'humain dans 90% des cancers du sein (Tsarfaty I., Gène, 93, (1990) 10 p. 313 à 318);
- la séquence contrôlant l'expression prostatique de la protéine sécrétoire prostatique PSP94; dans les cancers de la prostate à un stade avancé, après prostatectomie, le seul tissu de l'organisme synthétisant la PSP94 est le tissu tumoral prostatique (Linard C., Gene, 73 (1988), p. 15 479-487);
- la séquence contrôlant l'expression de la protéine pHGR11 associée au mélanome, au cancer ovarien, à l'adénocarcinome du côlon et de la prostate; les seules cellules normales où pHGR11 est exprimé, sont les cellules de la granulosa de l'ovaire (Rapp G., DNA and cell Biology, vol. 9, n° 7, p. 479-485);
- la séquence contrôlant l'expression de la protéine pHGR74, exprimée dans les testicules, la prostate, la vésicule séminale et la granulosa de l'ovaire;
- ainsi que les séquences contrôlant l'expression de protéines spécifiques de l'épithélium mammaire, de l'épithélium utérin;
- la séquence contrôlant l'expression de la tyrosinase, exprimée dans les mélanocytes et le mélanome malin (Kwon B., PNAS, vol. 84, p. 7473-7477);
- les séquences contrôlant l'expression de l'élastase, exprimée uniquement dans le pancréas exocrine (Cell, vol. 9, 30 435-443 (1987));
- la séquence contrôlant l'expression hypophysaire de la prolactine (Peers B., Molecular and Cellular Biology, sept. 35 1990, p. 4690-4700).

L'invention concerne également une composition

pharmaceutique pour le traitement de cellules cancéreuses ou infectées par des agents viraux comprenant une ou plusieurs de ces séquences et un véhicule pharmaceutique adéquats.

Selon une forme préférentielle de l'invention, 5 cette composition pharmaceutique contient également un ou plusieurs agents viraux sauvages appartenant au groupe des parvovirus.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de ces compositions pharmaceutiques pour la préparation 10 d'un médicament destiné au traitement de cancers ou d'infections.

Les exemples ci-après sont donnés à titre purement indicatif et permettent d'illustrer d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention par un virus.

15 **Exemple I: Traitement de l'infection à H.I.V.**

Les séquences virales utilisées sont d'une part la séquence LTR 5' du HIV modifié de façon à être contrôlé par la protéine TAT du HIV et à échapper au contrôle de facteurs de transactivation cellulaire, et d'autre part, la séquence 20 RRE placée sous le contrôle de la protéine Rev du HIV et liée à la séquence CRS adjacente. Le gène effecteur placé entre ces deux séquences est le gène codant pour le fragment A de la toxine diphtérique. Ces deux séquences imposent une double sécurité à l'expression du fragment A qui ne pourra se faire 25 que dans les cellules infectées par le HIV qui produisent (même à bas bruit comme dans les infections latentes) à la fois les protéines TAT et REV. La séquence TAR (contrôlée par TAT) et la séquence RRE (REV Responsive Element) de HIV-1 répondent aux protéines TAT et REV de HIV-1 et HIV-2 ainsi 30 qu'aux protéines TAX et REX de HTLV-1. Le grand degré de conservation de ces séquences permet de traiter les cellules infectées par les différentes souches de HIV à l'aide de la même construction. L'avantage du parvovirus sur les autres vecteurs de transfection est qu'il n'y a pas intégration de 35 son matériel génétique qui reste sous forme épisomiale et ne risque pas d'inactiver un gène oncosupresseur ou d'activer un protooncogène.

L'innocuité et l'efficacité d'un tel traitement

devraient permettre son administration également aux patients séropositifs en phase d'infection latente asymptomatique. Le fragment A libéré dans les cellules infectées par HIV non seulement entraîne la mort cellulaire mais bloque également 5 toute synthèse protéique y compris la synthèse des protéines virales et de ce fait bloque la réinfection des cellules voisines.

Procédé d'obtention de la construction vectorielle:

1. Isolation de la séquence régulatrice transactivable

10 - Amplification par PCR du fragment (-85, +78) du LTR de HIV-I et insertion aux sites SmaI (715 Blunt) et Hind III (689) (compatible avec +78 = site Hind III) du plasmide p Bluescript SK +/-®.

15 La séquence LTR de HIV est ainsi dépourvu des sites NF-KB mais conserve 3 sites SP1, la TATA Box et le TAR (TAT Responsive Element).

2. Isolation et intégration du gène effecteur cisactivable

10 - Amplification par PCR du fragment DTA placé entre les nucléotides (79) et (653)

20 - formation de l'oligomère Hind III - ATG - (79) - DTA dont l'amorce a la séquence:
AAGCTTATGGCTGATGATGTTGATTCT
et de l'oligomère DTA - (653) - TAG - KPnI dont l'amorce a la séquence:
ACACGTCCTTACGACAGTCGGCATCCATGG

25 - Insertion du Hind III ATG - (79) - DTA - (653) TAG - KPnI aux sites Hind III (689) et KPnI (657) du plasmide p Bluescript SK +/- LTR HIV.

30 - Isolation du fragment (2668 bp): KPnI (6346) - CRS - RRE - KpnI (9014) du HIV-I.

- Insertion au site KPnI (657) du plasmide p Bluescript SK +/- LTR - DTA (insertion dans les deux orientations).

- Isolation du fragment

35 BamH I (Bluescript 719) ~ BamH I (HIV 8474) ayant la bonne orientation (2865 pb) et un autre fragment mal orienté (1277 pb).

3. Intégration du gène effecteur et de séquence régulatrice

dans le vecteur parvoviral

Digestion du vecteur PMM984 (vecteur MVM) par NCO I (259)
et Xba I (4335)

5 ajouter polylinker Bgl II
insérer fragment BamH I - LTR - DTA - CRS - RRE - BamH I
et sélectionner les clones ayant la bonne orientation.

4. Clonage du vecteur dans E. coli

10 Les clones ayant la bonne orientation sont sélectionnés
et les plasmides isolés.

(Le pMM 984 a tendance lorsqu'il est propagé dans E. Coli
de perdre 40 ou 97 paires de base dans le palindrome
droit, ce qui n'est pas le cas dans Epicurian Coli sure
(Stratagène®)).

15 5. Production de virions

Pour encapsider le génome parvoviral recombinant, un
plasmide helper (soit le pMM 984 soit un pMM 984 présentant
une déletion dans le palindrome droit) est cotransferté avec le plasmide recombinant sélectionné dans des
20 cellules tumorales.

Après 2 jours de culture, les surnageants (2 jours par
transfection) sont récoltés. Les cellules sont congelées
et décongelées et les virions récoltés et isolés sur
gradient de chlorure de césium.

25 De même, on peut aussi utiliser dans le procédé susmentionné des cellules "emballeuses" produisant de façon
constitutive ou inducible VP1 et VP2.

Exemple 2: Traitement du cancer du seinProcédé d'obtention de la construction vectorielle30 1. Isolation de la séquence régulatrice transactivable

- Amplification par PCR du fragment

GAG Hind III - H23 Ag (280) ~ H23 Ag (784) - EcoR I -
GAG de 584 paires de bases de la 5' flanking sequence
de H23 Ag (ATG en 785) à partir de l'ADN génomique de
35 la lignée (T47D) du cancer mammaire humain.

Les amorce utilisées sont pour:

- GAG Hind III - H23 Ag (280-300)

5' GAGAAGCTTATCCAGCCCTCTTATTCTC 3'

- H23 Ag (764-784) - EcoR I - GAG.
GGGTGGGTAAAGTCCTGGTGG - CTTAAGCTC
- Digestion par Hind III et EcoR I et insertion aux sites Hind III (689) et EcoR I (701) du plasmide p Bluescript SK +/-.

5 2. Isolation et intégration du gène effecteur cisactivable

- Amplification par PCR du fragment

GAG EcoR I - ATG Diphtheria Toxin DTA (79-653) TAG - Xba I - GAC

10 fragment codant pour la portion toxique de la toxine diphtérique dépourvue de la séquence "hydrophobic leader signal sequence"

dont l'amorce GAG EcoR I ATG - DTA (79-100) a la séquence:

15 GAGGAATTCATGGCTGATGATGTTGTTGATTCT

dont l'amorce DTA (631-653) - TAG - Xba I - GAG a la séquence:

ACACGTCCCTTAGCACAGTCCGCATCAGATCTCTC

- Digestion par EcoR I et Xba I et insertion du fragment DTA aux sites EcoR I (701) et Xba I (731) du plasmide p Bluescript SK +/- contenant le fragment H23 Ag.

20 3. Intégration du gène effecteur et de sa séquence régulatrice dans le vecteur parvoviral:

25 Le site Hind III du plasmide PBR 322 dans PMM 984 est détruit en enlevant le fragment Cla I - Nhe I du PBR 322 et en rendant "blunt" les extrémités 5' protrudentes en présence du fragment de Klenow de la DNA polymérase d'E. Coli.

Le PMM 984 (Hind III PBR 322-) est alors recircularisé.

- 30 - Digestion par Hind III et Xba I et insertion du fragment H23 - ATG - DTA TAG aux sites Hind III (2650) et Xba I (4339) du plasmide (dépourvu du site Hind III du PBR 322) PMM 984 en remplacement des séquences codant pour les protéines VP1 et VP2 du MVMp.

35 On obtient donc la séquence suivante du MVMp modifié: Palindrome, Promoteur P4, NSI, NSII, promoteur P38 région promoteur enhancer H23 - ATG - DTA - TAG - sites de polydénylation du MVM, Palindrome.

4. Cotransfection avec du DNA plasmidique de parvovirus sauvage (ou virus avec palindrome 5' non-fonctionnel) pour fournir les capsides virales (VP1 et VP2) dans les cellules productrices de virions.

5 Exemple 3: Construction vectorielle à utiliser pour le traitement et le diagnostic de cancer (cancer du sein)

1. Isolation de la séquence régulatrice transactivable

L'amplification par PCR du fragment

GAG Hind III - H23 Ag (280) ~ H23 Ag (784) - EcoR I - GAG et son insertion aux sites Hind III (689) et EcoR I (701) du plasmide p Bluescript SK +/- se fait comme précédemment.

2. Isolation et intégration du gène effecteur cisactivable

- Amplification par PCR du fragment

GAG EcoR I - ATG - HSV-1 Thymidine kinase (59 à 1189)

TGA Xba I - GAG

dont les primers sont pour:

GAG - EcoR I - ATG - Tk (59-80):

GAGGAATTCATGGCTTCGTACCCCGGCCAT

et pour Tk (1168-1189) Xba I - GAG:

CTCTACCCCCCTCCGATTGACTAGATCTCTC

- Insertion aux sites EcoR I (701) et Xba I (731) du plasmide p Bluescript SK +/- contenant le fragment H23 Ag.

25 3. Intégration du gène effecteur et de sa séquence régulatrice dans le vecteur parvoviral

Insertion du fragment H23 - Tk aux sites Hind III (2650) et Xba I (4339) du plasmide PMM 984.

30 Synthèse d'iodovinyldeoxyuridine marquée à l'iode 123 pour le traitement et la détection par gammacaméra de cellules cancéreuses exprimant l'HSV-I Tk après infection par le vecteur décrit ci-dessus (Samuel J. et al, Int. J. Appl. Radiat. Isot., vol. 35., n° 11, p. 1049-1052 (1984)).

Exemple 4: Construction vectorielle à utiliser pour le traitement de l'hépatome ou du choriocarcinome

1. Isolation de la séquence régulatrice transactivable

Amplification par PCR du fragment

GAG Hind III - AFP enhancer (-736, +44) - EcoR I - GAG

dont l'amorce pour GAG Hind III - AFP enhancer (-736, -716) est:

GAGAAGCTTAATGATGCACCTGACCCACTT

et dont l'amorce pour AFP enhancer (+24, +44) EcoR I GAG est:

TATTGTTTATTGATCGTTGGCTTAAGCTC

et insertion aux sites Hind III (689) et EcoR I (701) du plasmide p Bluescript SK +/-.

2. Isolation et intégration du gène effecteur sisactivable

10 Amplification par PCR du fragment GAG EcoR I - ATG - DTA (79-653) TAG - Xba I - GAG et insertion aux sites EcoR I (701) et Xba I (731) du plasmide p Bluescript SK +/- contenant l'AFP enhancer.

15 3. Insertion du gène effecteur et de sa séquence régulatrice dans le vecteur parvoviral

insertion du fragment AFP enhancer ATG DTA TAG aux sites Hind III (2650) et Xba I (4339) du plasmide PMM 984

Exemple 5: Traitement de l'infection à cytomegalovirus suivant chez les immunodéprimés

20 Chez les sujets à immunité normale, l'infection virale est combattue par des lymphocytes T cytotoxiques qui reconnaissent des peptides provenant de protéines virales ayant été dégradées après synthèse endogène par les cellules infectées. Ces peptides sont reconnus en association avec les 25 molécules du MHC classe I (Major Histocompatibility Complex). La destruction des cellules infectées empêche la propagation des virus aux autres cellules en inhibant leur réplication. Les défenses de l'organisme comprennent aussi la production intracellulaire d'interféron et la production d'anticorps 30 spécifiques. En l'absence de médicaments antiviraux spécifiques et tenant compte de l'efficacité limitée de l'immunothérapie passive, l'on propose dans l'invention de traiter les immunodéprimés atteint d'affection virale à l'aide de parvovirus modifiés en remplaçant les séquences codant pour NS-1, 35 NS-2, P38, VP-1 et VP-2 par une séquence promoteur "enhancer" contrôlée par des facteurs de transactivation spécifiques du virus infectant. Cette séquence contrôle l'expression d'un gène effecteur permettant aux cellules transfectées soit de

résister à l'infection soit d'être éliminées.

Bien que l'infection à cytomégalovirus soit asymptomatique chez les individus ayant un système immunitaire normal, elle devient une cause majeure de décès et de morbidité chez les patients à immunité soit immature (foetus, nouveau-né) soit compromise (receveurs d'allograffles, patients atteints du SIDA). Les infections intra-utérines à CMV sont la seconde cause d'arriération mentale après le syndrome de down. (Griffiths and al., Biochem. J. (1987), 241, 10 p. 313-324)

La pneumonie à CMV est la principale cause de mort après transplantation de moelle osseuse et l'infection discriminée à CMV est la cause majeure de morbidité et de mortalité chez les greffés rénaux ou chez les patients atteints 15 de SIDA.

Après l'infection de la cellule susceptible par le CMV, l'expression temporelle du génome du virus est étroitement contrôlée sous forme d'une synthèse en cascade d'ARN messager et de protéines. L'on distingue les gènes α (ou précoce immédiat), β (ou précoce retardé) et γ (ou tardif). Les produits des gènes α sont requis par le virus pour prendre le contrôle des synthèses de la cellule hôte, les produits β contrôlent la production de virions tandis que les produits γ forment les composants de structure du virion.

25

Les protéines α permettent la synthèse d'ARN messager β et les protéines β permettent la réplication de l'ADN qui est suivie par la synthèse de l'ARN messager γ .

Les gènes α et β sont transcrits par l'ARN polymérase II cellulaire. Leur expression est contrôlée par des séquences proximales par rapport au promoteur qui sont activées en trans par une protéine structurale du virion.

Selon l'invention, ces séquences sont insérées à la suite du promoteur P4 du parvovirus et sont suivies d'une 35 séquence codant pour un ARN ribozymial clivant spécifiquement l'ARN messager codant pour la protéine α la plus importante (Spaete and Mocarski, 1985, J. virol., 56, 135-143; Sternberg et al, 1984, J. virol., 49, 190-199). Les cellules

09201087

18

transfектées par le parvovirus modifié de la sorte sont protégées de l'infection par le CMV. En effet, lors de l'infection, l'enlèvement de l'enveloppe virale donne naissance à la protéine structurale qui transactivera la 5 séquence inclue dans le parvovirus et initiera la production de ribozymes anti mRNA de la protéine α .

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique destinée au traitement de cellules cancéreuses ou soumises à des infections, caractérisée en ce qu'elle comprend, intégré dans un vecteur viral 5 appartenant au groupe des parvovirus un gène effecteur susceptible d'assurer la destruction ou la normalisation desdites cellules.

2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 caractérisée en ce que le vecteur viral est choisi parmi 10 le groupe constitué par le parvovirus H1 et le parvovirus variant fibrotropique du "Minute virus of Mice" (MVMp).

3. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 caractérisée en ce que le vecteur viral est dépourvu des gènes codant pour les protéines de 15 capsides (VP1 et VP2) du parvovirus.

4. Séquence nucléotidique selon la revendication 3, caractérisée en ce que le vecteur viral est également dépourvu du promoteur P38 et des gènes codant pour les protéines non structurelles NSI et NSII du parvovirus.

20 5. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que le gène effecteur est choisi parmi:

- le gène codant pour une protéine cytotoxique, préférentiellement le fragment A de la toxine diphtérique (DTA),
- 25 - le gène codant pour une enzyme conférant à la cellule transfectée une sensibilité à un agent toxique, de préférence la thymidine kinase de l'Herpès simplex virus type 1 (HSV-TK), l'agent toxique étant un analogue de guanosine marqué à l'aide de radioisotopes émetteurs d'électrons 30 Auger tels l'Iode 123.

6. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle comprend également au moins une séquence régulatrice transactivable par des facteurs de transactivation spécifiques de 35 l'affection traitée ou du tissu cellulaire affecté et apte à cisactiver le gène effecteur.

7. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que la

séquence régulatrice comporte tout ou partie de la séquence régulatrice LTR des virus HIV comprenant la séquence TAR.

8. Séquence nucléotidique selon la revendication 7 caractérisée en ce que la séquence LTR est dépourvue de la 5 séquence enhancer NF-Kappa B transactivable par des facteurs cellulaires et/ou de la séquence NRE transactivable par le facteur viral NEF.

9. Séquence nucléotidique selon les revendications 7 ou 8 caractérisée en ce que la séquence nucléotidique 10 comporte en outre une seconde séquence régulatrice constituée de tout ou partie de la séquence RRE et de la séquence CRS des virus HIV et des sites adjacents d'épissages.

10. Séquence nucléotidique selon la revendication 6, caractérisée en ce que la séquence régulatrice est constituée d'une séquence promoteur "enhancer" spécifique du cytomégalovirus et que le gène effecteur est un ribozyme clivant spécifiquement l'ARN messager codant pour la protéine α du cytomégalovirus.

11. Séquence nucléotidique selon la revendication 20 6 caractérisée en ce que les séquences régulatrices comportent des promoteurs et/ou des enhancers transactivables dans certains tissus spécifiques et choisis parmi:

- la séquence d'ADN contrôlant l'expression du gène codant pour l' α foetoprotéine (AFP),
- la séquence contrôlant l'expression de la protéine placentaire humaine 11 (PP11),
- la séquence contrôlant l'expression de l'antigène CO - 029,
- la séquence contrôlant l'expression de l'antigène H23,
- la séquence contrôlant l'expression prostatique de la 30 protéine sécrétoire prostatique PSP94,
- la séquence contrôlant l'expression de la protéine pHGR11 associée au mélanome, au cancer ovarien, à l'adénocarcinome du côlon et de la prostate,
- la séquence contrôlant l'expression de la protéine pHGR74, exprimée dans les testicules, la prostate, la vésicule 35 séminale et la granulosa de l'ovaire,
- les séquences contrôlant l'expression de protéines spécifiques de l'épithélium mammaire, de l'épithélium utérin,

- la séquence contrôlant l'expression de la tyrosinase, exprimée dans les mélanocytes et le mélanome malin,
- les séquences contrôlant l'expression de l'élastase, exprimée uniquement dans le pancréas exocrine,
- 5 - la séquence contrôlant l'expression hypophysaire de la prolactine.

12. Composition pharmaceutique pour le traitement de cellules cancéreuses ou infectées par des agents viraux, caractérisée en ce qu'elle comprend une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et un véhicule pharmaceutique adéquat.

13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle contient également un ou plusieurs agents viraux sauvages appartenant au groupe des 15 parvovirus.

14. Utilisation de compositions pharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 12 ou 13, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de cancers ou d'infections.

20 15. Utilisation des séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de cancers ou d'infections.



I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the Dutch language in which the below identified application was filed, and that I believe the English translation of the Belgian Application No. 09201087 (filed on **December 10, 1992**) is a true and complete translation.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable.

Date : May 24, 2002.

Full name of the translator :


Eric VAN MALDEREN

Post Office Address : OFFICE VAN MALDEREN
Place Reine Fabiola 6/1
B-1083 BRUSSELS
BELGIUM

NUCLEOTIDE SEQUENCE FOR TREATING CANCER AND INFECTIONSubject of the invention

5 The present invention relates to a nucleotide sequence for treating cancerous or infected cells.

The invention also extends to the use of nucleotide sequences for the preparation of a medicinal product for treating cancerous or infected cells.

10 Technological background

The efficacy of conventional treatments of cancer and infections is limited by their lack of selectivity. Indeed, the toxicity linked to these treatments is not limited to the target cells (tumor cells, infected cells); 15 it also affects the normal cells of vital importance.

Consequently, systems have been developed for targeting therapeutic agents which make it possible to reduce the toxic dose administered to normal tissues while allowing an effective toxic dose to be administered to the 20 pathological tissues.

Patent US-4,675,382 describes hybrid proteins which are cleavable and which consist of cytotoxic fragments and cytospecific ligands, as well as their targeted therapeutic application in the treatment of medical disorders.

25 Proteins which are highly cytotoxic when they are introduced into mammalian cells are produced by many species of bacteria and plants (fragment A of diphtheria toxin (DT-A), from *Pseudomonas aeruginosa*, Ricin ...).

Attempts have been made to replace the portion of 30 these proteins responsible for cell entry with tumor-specific ligands (monoclonal antibodies, peptides ...) (Martinez et al, Cancer Surveys, 1, 374 (1982)).

Another strategy used by Maxwell (Cancer Research, 46, 4660-4664, September 1986), consists in introducing the 35 DNA encoding fragment A of diphtheria toxin in vitro into cells with the aid of constructs containing tissue-specific transcriptional regulatory elements which act in cis with the aim of expressing DTA only in the cells containing the

factors which act on these regulatory elements.

Other techniques using genes encoding an enzyme which confers on the transfected cell sensitivity to a toxic agent have been described by Moolten F. (Human Gene 5 Therapy 1: 125-134 (1990) and Venkatesh (P.N.A.S., Vol. 87, p. 8746-8750, November 1990).

The gene encoding Herpes simplex type 1 Thymidine kinase (HSV-TK) is appropriate for this type of therapy. Some guanosine analogs such as iodovinyldeoxyuridine 10 (IVDU), acyclovir, ganciclovir are substrates specific for HSV-TK, which catalyzes their phosphorylation to monophosphates more efficiently (more than a thousand times) than the thymidine kinases of mammalian cells. A subsequent phosphorylation to triphosphates under the 15 influence of cellular kinases converts these molecules to potent inhibitors of DNA synthesis. Ganciclovir doses which do not affect the in vitro survival of HSV-TK negative cells make it possible to destroy in vitro HSV-TK positive cells and to eradicate HSV-TK positive lymphomas in vivo in 20 transgenic mice expressing HSV-TK in their lymphoid cells.

However, for some cell lines expressing HSV-TK, the dose of guanosine analogs permitting an in vitro cytotoxicity of close to 100% cell death induces substantial cytotoxicity in cell lines not expressing HSV-TK 25 (doses between 10 and 100 μ M).

An approach which makes it possible to avoid this problem is to use guanosine analogs labeled with the aid of radioisotopes which emit AUGER electrons such as 123 Iodine (half-life 13h21min). These isotopes release most of their 30 energy over a distance of a few nanometers. The efficiency of such radioisotopes as regards cell cytotoxicity is completely lost when they are not bound or at the very most at a distance of a few nanometers from the DNA. If they are in the vicinity of the DNA, about fifty disintegrations are 35 sufficient to kill the HSV-TK positive cell. A maximum cytotoxicity is obtained when the cells incorporate the 123 Iodine labeled guanosine analog into their DNA at doses of less than 10^{-10} M which is substantially less than the

toxicity threshold of this analog for cells not possessing HSV-TK.

In addition, 123 Iodine also emits a γ radiation which can be detected with the aid of a gamma camera in 5 clinical medicine.

After in vivo concentration of the labeled analog in the tissues expressing HSV-TK and the elimination of the guanosine analog from the blood stream and the other tissues, it is possible to detect with the aid of a gamma 10 camera the tissues expressing HSV-TK (application to the detection of metastases).

This approach, compared with the expression of fragment A of diphtheria toxin, has the advantage of allowing control of the intensity and the course of the 15 cytotoxic attack.

The administration of the guanosine analog can be modulated as a function of the clinical development (development of the cancerous tissues and toxicity inflicted on the normal tissues).

20 In Patent Application WO 90/11359, Baltimore et al. describe recombinant nucleotide constructs containing regulatory sequences of the HIV virus and sequences encoding cytotoxic products which specifically affect the cells infected by the HIV or HTLV viruses.

25 The conserved viral sequence consists of all or part of the LTR (Long Terminal Repeat) regulatory sequence of the virus. This sequence can be transactivated at the level of a TAR promoter sequence by the specific viral transactivation factors TAT of the HIV viruses and TAX of 30 the HTLV viruses, expressed in the cells infected by these viruses (Sodroski J. et al., Science (1985) 227, 171-173).

The activation of the promoter sequence then allows the expression of the sequence encoding cytotoxic products which bring about the death of the cells infected by the 35 HIV virus.

However, such nucleotide constructs may contain LTR sequences other than the TAR sequence.

These sequences, such as the enhancer elements NF-

Kappa B (Greene, Annual Rev. Immunol., 1990, 8, p. 453) are transactivable by cellular activators, or such as the NRE element (Negative Regulatory Element) are transactivable by the viral factor NEF (Kieny, Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 3, p. 395 (1990)).

Such factors can therefore activate the cytotoxic genes in healthy cells or inactivate them in cells infected by the virus.

Patent Application WO 90/07936 and the document "Aids Research and Human Retroviruses" (vol. 8, no. 1, 1992, Mary Ann Liebert, Inc., Publisher) describe the integration, into viral vectors or plasmids, of nucleotide constructs containing regulatory sequences transactivable by factors specific for an affection (such as AIDS) and sequences encoding cytotoxic products which specifically affect cells subjected to hyperproliferative disorders or to infections.

However, these viral or plasmid vectors present a potential danger on integrating into the host cells of activating protooncogenes or of annihilating tumor suppressor genes.

Aims of the invention

The aim of the invention is to provide a viral vector containing a nucleotide sequence capable of destroying or of normalizing cancerous or infected cells.

Another aim of the invention consists in providing a viral vector which, without integrating into their genome, is capable of being efficiently expressed in the intracellular environment of said cells.

Main elements of the invention

The invention relates to a nucleotide sequence for treating cancerous or infected cells comprising, integrated into a viral vector belonging to the group of parvoviruses, an effector gene capable of bringing about the destruction or the normalization of the cells.

The term "treatment" is understood to mean a reduction or a decrease in the symptoms of the condition, the elimination or the inhibition of the causative agents,

the prevention of cell infection or disorder in subjects suffering from the condition.

The term "infection" relates to infections of cells by viral or bacterial agents or by other intracellular 5 infectious parasites.

The invention concerns more particularly viral infectious agents such as HIV-I, HIV-II, HIV-III, HTLV-I, HTLV-II, herpes simplex virus (HSV), cytomegalovirus (CMV), human papillomaviruses (HPV) and other similar viruses.

10 The most appropriate vectors for this in vivo gene transfer are viruses belonging to the group of autonomous parvoviruses. They are small viruses, with no envelope, whose genome consists of a linear single-stranded DNA of about 5 KD. Their low genetic complexity makes them totally 15 dependent on exogenous factors for their replication. They replicate efficiently only in the intracellular environment of tumor cells in which they exist in episome form (J. Rommelaere, Handbook of Parvoviruses, 1990, vol. 2, p. 41-57, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida).

20 They do not become integrated into the genome of cells like retroviruses and do not therefore present the potential danger of activating protooncogenes or of annihilating tumor suppressor genes. Their oncotropic and their episomal character make them preferred vectors for 25 targeted gene therapy of tumors and of intracellular infections.

Preferably, the viral vector used is the H1 Parvovirus or the fibrotropic parvovirus of "minute virus of mice" (MVMp).

30 Most human cancer cell lines tested up until now have proved to be permissive for infection by H1 parvoviruses and the fibrotropic variant of the "minute virus of mice (MVMp). These viruses have oncoprotective properties in vivo and can cause the regression of human tumors in 35 nude mice even after viral inoculation at a site distant from the tumor. H1 and MVMp are small viruses containing a single-stranded DNA of 5 kb bordered by 2 hairpin palindromic loops.

In these parvoviruses, two promoters, P4 and P38, respectively control the expression of two nonstructural proteins (NSI and NSII) and of two capsid proteins (VP1 and VP2). P4 controls NSI and NSII and P38, VP1 and VP2. NSI is 5 a P38 transactivation factor and is responsible for the cytotoxic activity. NSI is in addition necessary for the viral replication and the restriction or permissivity for the viral infection appears to be linked at the level of the transcription of NSI.

10 Preferably, the viral vector used is chosen among the Parvovirus H1 and the fibrotropic variant Parvovirus of the "Minute virus of Mice" (MVMp).

According to a preferred embodiment of the invention, the viral vector lacks genes encoding the capsid 15 proteins (VP1 and VP2) of the parvovirus. Preferably, the viral vector also lacks the P38 promoter and the genes encoding the nonstructural proteins NSI and NSII of the Parvovirus.

The expression "bringing about the destruction or 20 the normalization of the cells" means that during an infection or in the course of a cancer, the expression of the effector sequence in the host cell makes it possible either to kill the latter, or to make it sensitive to a toxic exogenous agent or to make it capable of inhibiting 25 the action of the cancer or of the infectious agent.

The term "effector gene" relates to a nucleotide sequence which, when it is expressed (under the action of specific transactivation factors on the regulatory sequence), makes it possible to destroy or normalize the 30 treated cells.

According to a preferred embodiment of the invention, the effector gene encodes either a cytotoxic protein, 35 preferably fragment A of diphtheria toxin (DTA), or an enzyme, conferring on the transfected cell sensitivity to a toxic agent, said enzyme being preferably thymidine kinase from Herpes simplex virus

type

1 (HSV-TK) .

Among the different available cytotoxic proteins (DT-A, RicinA, Gelonin, *Pseudomonas aeruginosa* Toxin) the 5 choice of DT-A is preferred. Indeed, as the majority of the population has been vaccinated against the diphtheria toxin, any possible release of DT-A by the dead cells will be annihilated by the immune system. In addition, as DT-A lacks a site for binding to a cell receptor, it will not be 10 able to enter into other cells.

The production of DT-A in mammalian cells results in the inhibition of all subsequent protein synthesis (by ADP ribozylation of the elongation factor -2) and consequently leads to cell death. As DTA acts catalytically and 15 not stoichiometrically, a few DTA molecules are sufficient to kill a cell.

The A fragment released in the cells infected by HIV not only causes cell death, but also blocks any protein synthesis including the synthesis of viral proteins and 20 thereby blocks reinfection of the neighboring cells.

Advantageously, the effector gene can be modified for example by a site-directed mutagenesis so as to attenuate the cytotoxicity of the protein produced.

According to a preferred embodiment of the invention, 25 the nucleotide sequence also comprises at least one regulatory sequence transactivable by transactivation factors specific for the condition treated or for the affected cell tissue, and capable of cisactivating the effector gene.

30 The term "transactivable regulatory sequence" relates to a nucleotide sequence which is capable of responding to a specific transactivation factor and of activating in response the transcription of sequences situated in cis.

35 According to another embodiment of the invention, the regulatory sequence contains all or part of the LTR (Long Terminal Repeat) regulatory sequence of HIV or HTLV viruses comprising the TAR sequence (TAT responsive

element).

Preferably, the LTR sequence lacks the kappa B enhancer sequence transactivable by cellular factors and/or the NRE sequence transactivable by the viral factor NEF.

5 The suppression of these sequences in the LTR sequence reduce, surprisingly, the expression of the nucleotide sequence of the invention in the cells not expressing the TAT protein without reducing the expression of the nucleotide sequence of the invention in the cells
10 expressing the TAT protein.

Advantageously, the nucleotide sequence also contains a regulatory sequence consisting of all or part of the RRE sequence (Rev-Responsive Element) and of the adjacent CRS sequence of the HIV and HTLV viruses (Rosen,
15 P.N.A.S., vol. 85, p. 2071-2075 (1988)) and of adjacent splicing sites.

The TAR sequences (situated in the LTR of the HIV and HTLV viruses and transactivable by the viral proteins TAT from HIV and TAX from HTLV) and the RRE sequences
20 (situated in the ENV sequence of the HIV and HTLV viruses and responding to the proteins REV from HIV and REX from HTLV) and adjacent splicing sites are for example sequences which can be used for the treatment of infection by these retroviruses (Rosen G., Editorial Review, Aids 1990, 4,
25 499-509).

The high degree of conservation of these sequences makes it possible to treat the cells infected by the different HIV strains with the aid of the same nucleotide construct.

30 The effector gene sequence is also placed under the control of the Rev protein from HIV, because in the absence of Rev, any mRNA which contains the RRE sequence is blocked in the nuclear spliceosome and cannot be exported in the cytoplasm to the ribosomes.

35 According to another embodiment of the invention, the regulatory sequence consists of a promoter "enhancer" sequence specific for cytomegalovirus and the effector gene is a ribozyme which specifically cleaves the messenger RNA

encoding cytomegalovirus protein α (Griffiths P., Biochem J., 241, p. 313-324 (1987)).

According to another embodiment of the invention, the regulatory sequences consist of promoters and/or 5 enhancers transactivable in certain specific tissues, chosen from the group consisting of:

- the DNA sequence controlling the expression of the gene encoding fetoprotein α (AFP), this region being transactivated only in hepatoma and choriocarcinoma 10 cells and in rare hepatic cells (Sakai M., The Journal of Biological Chemistry, vol. 260, no. 8, p. 5055-5060 and Nakabayashi H., vol. 264, No. 1, p. 266-271);
- the sequence controlling the expression of human 15 placental protein 11 (PP11). PP11 is expressed only in the placenta (syncytiotrophoblast) and it is not found in any normal adult tissue, but using immunohistochemistry, it is detected in 47% of breast cancers, in 67% of ovarian carcinomas, and in 38% of testicular and gastric cancers studied (Grundmann U., 20 DNA and Cell Biology, vol. No. 9, No. 4, 1990, p. 243-250);
- the sequence controlling the expression of antigen CO - 029 which is detected in carcinomas of the stomach, colon, rectum and pancreas but is not 25 detected in normal tissues (Szala S., PNAS, vol. 87, p. 6833-6837 (1990));
- the sequence controlling the expression of antigen H23 (breast cancer-associated antigen) detected in humans in 90% of breast cancers (Tsarfaty I., Gène, 93, 30 (1990) p. 313 to 318);
- the sequence controlling the prostatic expression of prostatic secretory protein PSP94; in prostate cancers at an advanced stage, after prostatectomy, the only tissue in the body synthesizing PSP94 is the prostatic 35 tumor tissue (Linard C., Gene, 73 (1988), p. 479-487);
- the sequence controlling the expression of the protein pHGR11 associated with melanoma, ovarian cancer, adenocarcinoma of the colon and of the prostate; the

only normal cells where pHGR11 is expressed are the granulosa cells of the ovary (Rapp G., DNA and cell Biology, vol. 9, no. 7, p. 479-485);

5 - the sequence controlling the expression of protein pHGR74, expressed in the testicles, the prostate, the seminal vesicle and the granulosa of the ovary;

- as well as the sequences controlling the expression of proteins specific for the mammalian epithelium, for the uterine epithelium;

10 - the sequence controlling the expression of tyrosinase, expressed in the melanocytes and malignant melanoma (Kwon B., PNAS, vol. 84, p. 7473-7477);

- the sequences controlling the expression of elastase, expressed only in the exocrine pancreas (Cell, vol. 9, 15 435-443 (1987));

- the sequence controlling the hypophysial expression of prolactin (Peers B., Molecular and Cellular Biology, Sept. 1990, p. 4690-4700).

The invention also relates to a pharmaceutical 20 composition for treating cancerous cells or cells infected by viral agents comprising one or several of these sequences and a pharmaceutically acceptable vehicle.

According to a preferred embodiment of the invention, this pharmaceutical composition also comprises 25 one or more wild-type viral agents belonging to the group of parvoviruses.

Another aspect of the invention relates to the use of these pharmaceutical compositions for the preparation of a medicinal product for treating cancers or infections.

30 The examples below are given purely as a guide and make it possible to illustrate other characteristics and advantages of the present invention.

Example 1: Treatment of H.I.V. infection

The viral sequences used are, on the one hand, the 35 5'LTR sequence of HIV modified so as to be controlled by the HIV TAT protein and so as to escape control by cellular transactivation factors, and on the other hand, the RRE sequence placed under the control of the HIV Rev protein

and linked to the adjacent CRS sequence. The effector gene placed between these two sequences consists of the gene encoding fragment A of diphtheria toxin. These two sequences impose a double safety on the expression of the A 5 fragment which can only occur in the cells infected by HIV which produce (even at low noise such as in latent infections) both the TAT and REV proteins. The TAR sequence (controlled by TAT) and the RRE sequence (REV responsive element) from HIV-1 respond to the TAT and REV proteins 10 from HIV-1 and HIV-2 as well as to the TAX and REX proteins from HTLV-1. The high degree of conservation of these sequences makes it possible to treat cells infected by the different strains of HIV with the aid of the same construct. The advantage of the parvovirus over other 15 transfection vectors is that there is no integration of its genetic material, which remains in episomal form and does not risk inactivating an oncosuppressor gene or activating a protooncogene.

The innocuousness and efficacy of such a treatment 20 should also allow its administration to seropositive patients at the asymptomatic latent infection phase. The A fragment released in the cells infected by HIV not only causes cell death but also blocks any protein synthesis including the synthesis of viral proteins and thereby 25 blocks reinfection of neighboring cells.

Process for producing the vector construct:

1. Isolation of the transactivable regulatory sequence

- Amplification by PCR of the LTR fragment (-85, +78) from HIV-I and insertion into the SmaI (715 Blunt) 30 and Hind III (689) sites (compatible with +78 = Hind III site) of the plasmid p Bluescript SK +/-®. The LTR sequence from HIV thus lacks NFKB sites but conserves 3 SP1 sites, the TATA Box and TAR (TAT Responsive Element).

35 2. Isolation and integration of the cisactivable effector gene

- Amplification by PCR of the DTA fragment placed between the nucleotides (79) and (653)

- formation of the oligomer Hind III - ATG - (79) - DTA whose primer sequence is:
AAGCTTATGGCTGATGATGTTGATTCT
and of the oligomer DTA - (653) - TAG - KpnI whose
5 primer sequence is:
ACACGTCCTTAGCACAGTCCGCATCCCATGG
- Insertion of the Hind III ATG - (79) - DTA - (653) TAG - KpnI into the HindIII (689) and KpnI (657) sites of the plasmid p Bluescript SK +/- HIV LTR.
10 - Isolation of the fragment (2668 bp): KpnI (6346) - CRS - RRE - KpnI (9014) from HIV-I.
- Insertion into the KpnI site (657) of the plasmid p Bluescript SK +/- LTR - DTA (insertion in both orientations).
15 - Isolation of the fragment
BamH I (Bluescript 719) \leftrightarrow BamH I (HIV 8474) having the correct orientation (2865 bp) and another wrongly orientated fragment (1277 bp).
- 3. Integration of the effector gene and of the regulatory sequence into the parvoviral vector
20 Digestion of the vector pMM 984 (MVM vector) with Nco I (259) and Xba I (4335)
add Bgl II polylinker
insert fragment BamH I - LTR - DTA - CRS - RRE - BamH
25 I and select the clones having the correct orientation.
- 4. Cloning of the vector into E. coli
The clones having the correct orientation are selected and the plasmids isolated.
- 30 (pMM 984 tends, when it is propagated in E. Coli, to lose 40 or 97 base pairs in the right palindrome, which is not the case in Epicurian Coli sure (Stratagène®)).
- 5. Production of virions
35 To encapsidate the recombinant parvoviral genome, a help plasmid (either pMM 984 or a pMM 984 having a deletion in the right palindrome) is cotransfected with the recombinant plasmid selected in tumor cells.

After 2 days of culture, the supernatants (2 days per transfection) are harvested. The cells are frozen and thawed and the virions harvested and isolated on a cesium chloride gradient.

5 Likewise, it is also possible to use in the above-mentioned process "packaging" cells constitutively or inducibly producing VP1 and VP2.

Example 2: Treatment of breast cancer

Process for the production of the vector construct

10 1. Isolation of the transactivable regulatory sequence

- Amplification by PCR of the fragment

GAG Hind III - H23 Ag (280) ↔ H23 Ag (784) - EcoRI - GAG of 584 base pairs of the 5' flanking sequence of H23 Ag (ATG in 785) from the genomic DNA of the human mammary cancer line (T47D).

15

The following primers are used for:

- GAG Hind III - H23 Ag (280-300)

5' GAGAAGCTTATCCAGCCCTCTTATTCTC 3'

- H 23 Ag (764-784) - EcoR I - GAG.

20

GGGTGGGTAAAGTCCTGGTGG - CTTAAGCTC

- Digestion with HindIII and EcoR I and insertion into the Hind III (689) and EcoR I (701) sites of the plasmid p Bluescript SK +/-.

25 2. Isolation and integration of the cisactivable effector gene

- Amplification by PCR of the fragment

GAG EcoRI - ATG Diphtheria Toxin DTA (79-653) TAG - Xba I - GAC

30 fragment encoding the toxic portion of the diphtheria toxin lacking the "hydrophobic leader signal sequence"

whose GAG EcoR I ATG - DTA (79-100) primer sequence is:

GAGGAATTCATGGCTGATGATGTTGTTGATTCT

35

whose DTA (631 - 653) - TAG - Xba I - GAG primer sequence is:

ACACGTCCTTAGCACAGTCCGCATCAGATCTCTC

- Digestion with EcoR I and Xba I and insertion of

the DTA fragment into the EcoRI (701) and XbaI (731) sites of the plasmid p Bluescript SK +/- containing the H23 Ag fragment.

3. Integration of the effector gene and of its regulatory sequence into the parvoviral vector:

5 The Hind III site of the plasmid PBR 322 into pMM 984 is destroyed by removing the Cla I - Nhe I fragment from PBR 322 and by making "blunt" the protruding 5' ends in the presence of the Klenow fragment of DNA polymerase from E. Coli.

10 The pMM 984 (Hind III PBR 322-) is then recircularized.

15 - Digestion with Hind III and Xba I and insertion of the fragment H23 - ATG - DTA TAG into the Hind III (2650) and Xba I (4339) sites of the plasmid (lacking the Hind III site of PBR 322) pMM 984 by replacing the sequences encoding the VP1 and VP2 proteins of MVMP.

20 The following sequence is therefore obtained from the modified MVMP:

Palindrome, Promoter P4, NS I, NS II, Promoter P38, promoter enhancer region H23 - ATG - DTA - TAG - MVM polyadenylation sites, Palindrome.

25 4. Cotransfection with wild-type parvovirus plasmid DNA (or virus with nonfunctional 5' palindrome) in order to provide the viral capsids (VP1 and VP2) in the virion-producing cells.

Example 3: Vector construct to be used for the treatment and diagnosis of cancer (breast cancer)

30 1. Isolation of the transactivable regulatory sequence
The amplification by PCR of the fragment GAG Hind III - H23 Ag (280) ↔ H23 Ag (784) - EcoR I - GAG and its insertion at the Hind III (689) and EcoR I (701) sites of the plasmid p Bluescript SK +/- is performed as above.

2. Isolation and integration of the cisactivable effector sequence

- Amplification by PCR of the fragment

5 GAG EcoR I - ATG - HSV-1 Thymidine kinase (59 to 1189) TGA Xba I - GAG

whose primers are for:

GAG - EcoR I - ATG - Tk (59-80) :

GAGGAATTCATGGCTTCGTACCCGGCCAT

and for Tk (1168-1189) Xba I - GAG:

10 CTCTACCCCTCCGATTGACTAGATCTCTC

- Insertion at the EcoR I (701) and Xba I (731) sites of the plasmid p Bluescript SK +/- containing the H23 Ag fragment.

3. Integration of the effector gene and of its regulatory sequence into the parvoviral vector

15 Insertion of the fragment H23 - Tk into the Hind III (2650) and Xba I (4339) sites of the plasmid pMM 984.

20 Synthesis of iodovinyldeoxyuridine labeled with 123 Iodine for the treatment and detection, using a gamma camera, of cancerous cells expressing HSV-I Tk after infection with the vector described above (Samuel J. et al., Int. J. Appl. Radiat. Isot., vol. 35., No. 11, p. 1049-1052 (1984)).

Example 4: Vector construct to be used for the treatment of hepatoma or choriocarcinoma1. Isolation of the transactivable regulatory sequence

30 Amplification by PCR of the fragment

GAG Hind III - AFP enhancer (-736, +44) - EcoR I - GAG whose primer for GAG Hind III - AFP enhancer (-736, -716) is:

GAGAAGCTTAATGATGCACCTGACCCACTT

35 and whose AFP enhancer (+24, +44) EcoR I GAG is:

TATTGTTTATTGATCGTGGCTTAAGCTC

and insertion into the Hind III (689) and EcoR I (701) sites of the plasmid p Bluescript SK +/-.

2. Isolation and integration of the cisactivable 5 effector gene

10 Amplification by PCR of the fragment GAG EcoR I - ATG - DTA (79-653) TAG - Xba I - GAG and insertion into the EcoR I (701) and Xba I (731) sites of the plasmid p Bluescript SK +/- containing the AFP enhancer.

15 3. Insertion of the effector gene and of its regulatory sequence into the parvoviral vector

15 Insertion of the fragment AFP enhancer ATG DTA TAG into the Hind III (2650) and Xba I (4339) sites of the plasmid pMM 984 .

Example 5: Treatment of cytomegalovirus infection occurring in immunosuppressed individuals

In subjects with normal immunity, viral infection is combated by cytotoxic T lymphocytes which 20 recognize peptides derived from viral proteins which have been degraded after endogenous synthesis by the infected cells. These peptides are recognized in association with the MHC class I (Major Histocompatibility Complex) molecules. The destruction of the infected cells prevents 25 the propagation of the viruses to the other cells by inhibiting their replication. The body's defences also comprise the intracellular production of interferon and the production of specific antibodies. In the absence of specific antiviral drugs and taking into account the 30 limited efficacy of passive immunotherapy, it is proposed in the invention to treat immunosuppressed individuals suffering from viral conditions with the aid of parvoviruses modified by replacing the sequences encoding NS-1, NS-2, P38, VP-1 and VP-2 with a promoter "enhancer" 35 sequence controlled by transactivation factors specific for

the infecting virus. This sequence controls the expression of an effector gene allowing the transfected cells either to resist the infection or to be eliminated.

Although cytomegalovirus infection is 5 asymptomatic in individuals having a normal immune system, it becomes a major cause of death and morbidity in patients with either an immature (fetus, newborn) or compromised (recipients of allografts, patients suffering from AIDS) immunity. Intrauterine CMV infections are the second cause 10 of mental retardation after Down's Syndrome (Griffiths and al., Biochem. J. (1987), 241, p. 313-324).

CMV pneumonia is the principal cause of death after bone marrow transplant and discriminate CMV infection is the major cause of morbidity and mortality in 15 renal transplant patients or in patients suffering from AIDS.

After infection of the susceptible cell by CMV, temporal expression of the virus genome is closely controlled under the form of a cascade synthesis of 20 messenger RNA and of proteins. The α (or immediate early), β (or retarded early) and γ (or late) genes can be distinguished. The products of the α genes are required by the virus in order to take control of the syntheses of the host cell, the β products control the production of virions 25 whereas the γ products form the structural components of the virion.

The α proteins allow the synthesis of β messenger RNA and the β proteins allow the replication of DNA which is followed by the synthesis of γ messenger RNA.

30 The α and β genes are transcribed by cellular RNA polymerase II. Their expression is controlled by sequences proximal in relation to the promoter which are activated in trans by a structural protein of the virion.

According to the invention, these sequences

are inserted after the P4 promoter of the parvovirus and are followed by a sequence encoding a ribozymial RNA which specifically cleaves the messenger RNA encoding the most abundant α protein (Spaete and Mocarski, 1985, J. virol., 56, 135-143; Sternberg et al, 1984, J. virol., 49, 190-199). The cells transfected by the parvovirus modified in this manner are protected from infection by CMV. Indeed, during infection, the removal of the viral envelope gives rise to the structural protein which will transactivate the sequence included in the parvovirus and will initiate the production of ribozymes to mRNA of the α protein.

CLAIMS

1. Nucleotide sequence for treating cancerous or infected cells, characterized in that it comprises,
5 integrated into a viral vector belonging to the group of parvoviruses, an effector gene capable of bringing about the destruction or the normalization of said cells.
2. Nucleotide sequence according to claim 1, characterized in that the viral vector is chosen from the
10 group consisting of the parvovirus H1 and the fibrotropic parvovirus variant of the "Minute virus of Mice" (MVMp).
3. Nucleotide sequence according to any of the claims 1 or 2, characterized in that the viral vector lacks genes encoding the parvovirus capsid proteins (VP1 and VP2).
- 15 4. Nucleotide sequence according to claim 3, characterized in that the viral vector further lacks the promoter P38 and the genes encoding the parvovirus non-structural proteins NS I and NS II.
- 20 5. Nucleotide sequence according to any of the preceding claims, characterized in that the effector gene is chosen from the group consisting of:
 - the gene encoding a cytotoxic protein, preferably fragment A of diphtheria toxin (DTA),
 - the gene encoding an enzyme, conferring on the
25 transfected cell sensitivity to a toxic agent, preferably thymidine kinase from Herpes simplex virus type 1 (HSV-TK), said toxic agent being a guanosine analog labeled with the aid of radioisotopes which emit Auger electrons such as 123 Iodine.
- 30 6. Nucleotide sequence according to any of the preceding claims, characterized in that it also comprises at least one regulatory sequence transactivable by transactivation factors specific for the condition treated or for the affected cell tissue, and capable of
35 cisactivating the effector gene.
7. Nucleotide sequence according to any of the preceding claims, characterized in that the regulatory sequence contains all or part of the LTR regulatory

sequence of HIV or HTLV viruses comprising the TAR sequence.

8. Nucleotide sequence according to claim 7, characterized in that the LTR sequence lacks the enhancer sequence NF-Kappa B transactivable by cell factors and/or the sequence NRE transactivable by the viral factor NEF.

5 9. Nucleotide sequence according to claims 7 or 8, characterized in that the nucleotide sequence further contains a second regulatory nucleotide sequence consisting of all or part of the sequence RRE and of the sequence CRS of HIV viruses and of the adjacent splicing sites.

10. Nucleotide sequence according to claim 6, characterized in that the regulatory sequence consists of a promoter "enhancer" sequence specific for the cytomegalovirus and that the effector gene is a ribozyme which specifically cleaves the messenger RNA encoding the cytomegalovirus α protein.

11. Nucleotide sequence according to claim 6, characterized in that the regulatory sequences contain promoters and/or enhancers transactivable in certain specific tissues and chosen from the group consisting of:

- the DNA sequence controlling the expression of the gene encoding the α fetoprotein (AFP),
- the sequence controlling the expression of human placental protein 11 (PP11),
- the sequence controlling the expression of antigen CO - 029,
- the sequence controlling the expression of antigen H23,
- the sequence controlling the prostatic expression of prostatic secretory protein PSP94,
- the sequence controlling the expression of the protein pHGR11 associated with melanoma, ovarian cancer, adenocarcinoma of the colon and of the prostate,
- the sequence controlling the expression of the protein pHGR74, expressed in the testicles, the prostate, the seminal vesicle and the granulosa of the ovary,
- the sequences controlling the expression of proteins

specific for the mammalian epithelium, for the uterine epithelium,

- the sequence controlling the expression of tyrosinase, expressed in the melanocytes and malignant melanoma,
- the sequences controlling the expression of elastase, expressed only in the exocrine pancreas,
- the sequence controlling the hypophysial expression of prolactin.

12. Pharmaceutical composition for treating cancerous cells or cells infected by viral agents, characterized in that it comprises one or several nucleotide sequences according to any of the claims 1 to 11 and a 5 pharmaceutically acceptable vehicle.

13. Pharmaceutical composition according to claim 12, characterized in that it further comprises one or more wild-type viral agents belonging to the group of parvoviruses.

14. Use of pharmaceutical compositions according to any of the claims 12 to 13 for the preparation of a medicinal product for treating cancers or infections.

15. Use of nucleotide sequences according to any of the claims 1 to 11 for the preparation of a medicinal product for treating cancers or infections.